REAL TIME PCR

DETECTION KIT

Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	**VS-KGE106L**
VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	**VS-KGE106H**
VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	**VS-KGE112L**
VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E.histolytica* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	**VS-KGE112H**
VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	**VS-KGE113L**
VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	**VS-KGE113H**

For information purposes only

VIASURE

ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific detection and differentiation of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in human stool samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from stool specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica*.

2. Summary and Explanation

Enteric protozoa continue to be the most commonly encountered parasitic diseases affecting millions of people each year and causing significant morbidity and mortality worldwide. Among them, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, and *Giardia lamblia* are the major etiological agents.

Cryptosporidium can be acquired through person-to-person, contact with companion and farm animals, ingestion of contaminated food, drinking water and recreational water. *Cryptosporidium* can be present without symptoms or cause diarrhea and abdominal discomfort with weight loss and malabsorption. *Giardia lamblia* infection occurs by the faecal-oral route transmission, either through direct contact or by ingestion of contaminated food or water. Diarrhoea is the major symptom of the disease but the clinical manifestations vary; from non-symptomatic infections to severe diarrhea, abdominal cramps, bloating and flatulence often accompanied by nausea and weight loss. *Entamoeba histolytica* disease is spread primarily by food or water contaminated with cysts but may also be transmitted from person to person by faecal-oral route. Clinical features of amoebiasis range from asymptomatic colonization (90% of the cases) to amoebic dysentery (stomach pain, nausea or vomiting and severe diarrhea with bloody and slimy stools, fever) and invasive extraintestinal disease, most commonly in the form of liver abscesses.

Microscopy has been considered to be the gold standard method for diagnosis of these parasites, however is time-consuming, not very sensitive and unable to distinguish the invasive pathogenic *E. histolytica* from the commensal parasite *E. dispar.* Real-time PCR assay is less labor-intensive and has higher sensitivity and specificity, making it an attractive alternative.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* in human stool samples. After DNA isolation, the identification of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* is performed by the amplification of a conserved region of the 18S rRNA gene for *Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *Entamoeba histolyica* respectively, using specific primers and a fluorescent–labelled probe.

For information purposes only

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit is based on 5´ exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. *Cryptosporidium* DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel, *Giardia lamblia* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Entamoeba histolytica* DNA targets are amplified and detected in ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-KGE1SL/ VS-KGE1SH	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-KGE1C	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-KGE106L, VS-KGE106H, VS-KGE112L and VS-KGE112H.

For information purposes only

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-KGE1PL/ VS-KGE1PH	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-KGE1C	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-KGE113L and VS-KGE113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40ºC until expiration date stated in the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.

For information purposes only

- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For longer storage, the samples must be frozen at -20ºC. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

8.1.1. DNA EXTRACTION

For DNA extraction from human stool samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer´s instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).
- RIDA® Xtract (R-biopharm).
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica Positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the

For information purposes only

lyophilized *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNAse/DNAse free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR PROTOCOL

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

1) **Reconstitute the number of wells you need.**

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) **Adding samples and controls.**

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) **Set up your thermocycler.**

Program your thermocycler following the conditions below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95ºC
45	Denaturation	10 seg	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60ºC

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the Cy5 (*Cryptosporidium*), FAM (*Giardia lamblia*), ROX (*Entamoeba histolytica*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Cryptosporidium, Giardia lamblia and Entamoeba histolytica* positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer´s instructions.

Using the following table read and analyse the results:

For information purposes only

Cryptosporidium	*Giardia lamblia*	*E. histolytica*	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	***Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *E. histolytica* Positive**
-	-	-	+	-	+	***Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *E. histolytica* Negative**
+	-	-	+/-	-	+	***Cryptosporidium* Positive, *Giardia lamblia* and *E. histolytica* Negative**
+	+	-	+/-	-	+	***Cryptosporidium* and *Giardia lamblia* Positive, and *E. histolytica* Negative**
+	-	+	+/-	-	+	***Cryptosporidium* and *E. histolytica* Positive, and *Giardia lamblia* Negative**
-	+	-	+/-	-	+	***Giardia lamblia* Positive, *Cryptosporidium* and *E. histolytica* Negative**
-	+	+	+/-	-	+	***Giardia lamblia* and *E. histolytica* Positive, *Cryptosporidium* Negative**
-	-	+	+/-	-	+	***E. histolytica* Positive, *Cryptosporidium* and *Giardia lamblia* Negative**
+	+	+	+	+	+	**Experiment fail**
-	-	-	-	-	-	**Experiment fail**

Table 4. Sample interpretation

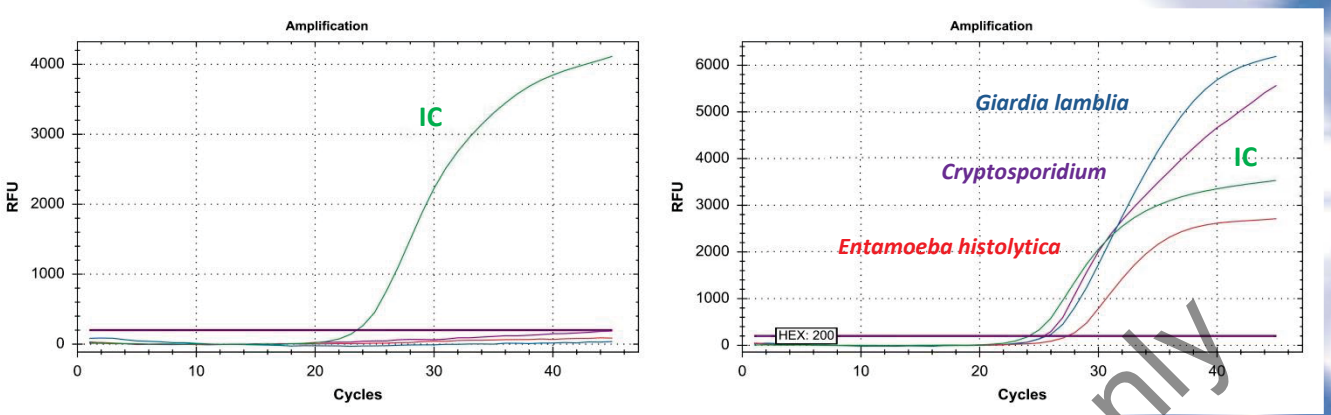
+: Amplification curve
-: No amplification curve

For information purposes only

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control

Positive control

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with human faecal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from faecal specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Cryptosporidium, Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica*, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

For information purposes only

The clinical performance of VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit was testing using 172 faecal samples from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by two commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE Parasitic Stool Panel (R-biopharm) or FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS).

The results were as follows:

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	38	3*#	41
-	1#	130	131
Total	39	133	172

Table 5. Comparative results of *Cryptosporidium*

These 4 samples have been evaluated by an additional in-house Real Time PCR (Hadfield et al., 2011), confirming our results.

* The low amount of template DNA detected in these samples is below the detection limit of the method used and so it may produce random positive results.

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	58	2*	60
-	0	112	112
Total	58	114	172

Table 6. Comparative results of *Giardia lamblia*

* The low amount of template DNA detected in these samples is below the detection limit of the method used and so it may produce random positive results.

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	8ϕ	1ϕ,*	9
-	0	163	163
Total	8	164	172

Table 7. Comparative results of *Entamoeba histolytica*

* The low amount of template DNA detected in these samples is below the detection limit of the method used and so it may produce random positive results.

ϕ Positive results were obtained for seven clinical stool specimens and 2 samples which were spiked with culture of *Entamoeba histolytica* prior to DNA extraction.

For information purposes only

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* using VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥50 DNA copies per reaction for *Cryptosporidium* and ≥10 DNA copies per reaction for *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* (Figure 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of *Cryptosporidium* (10^7-10^2 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).

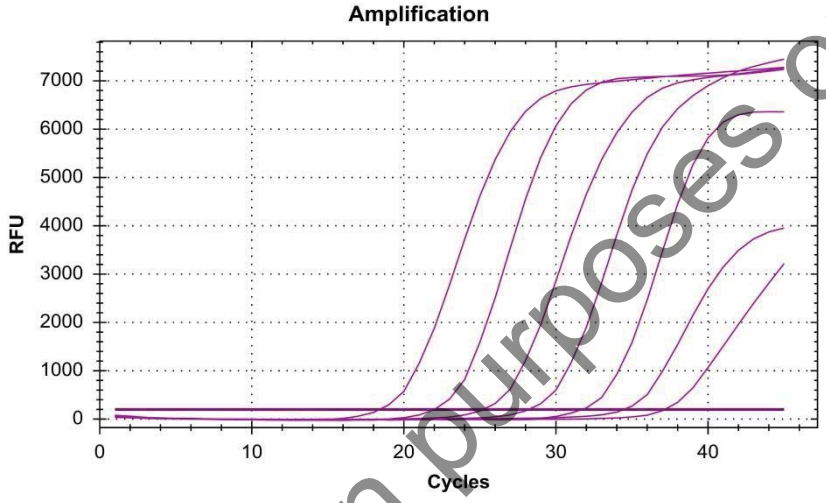
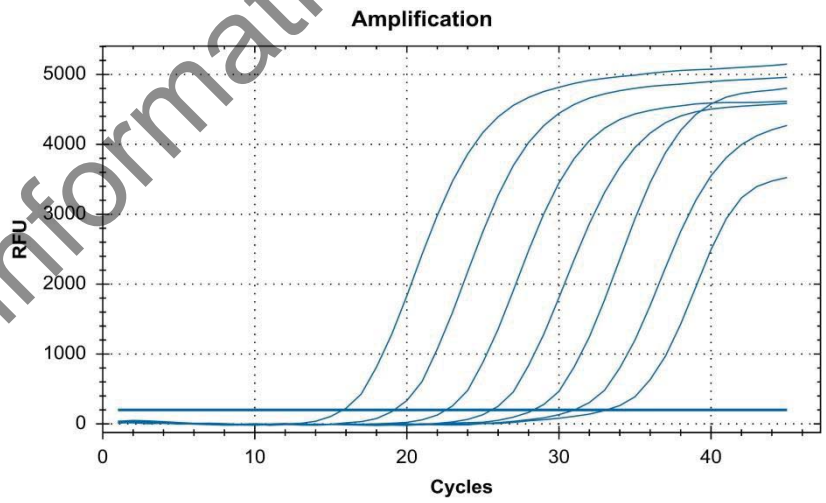
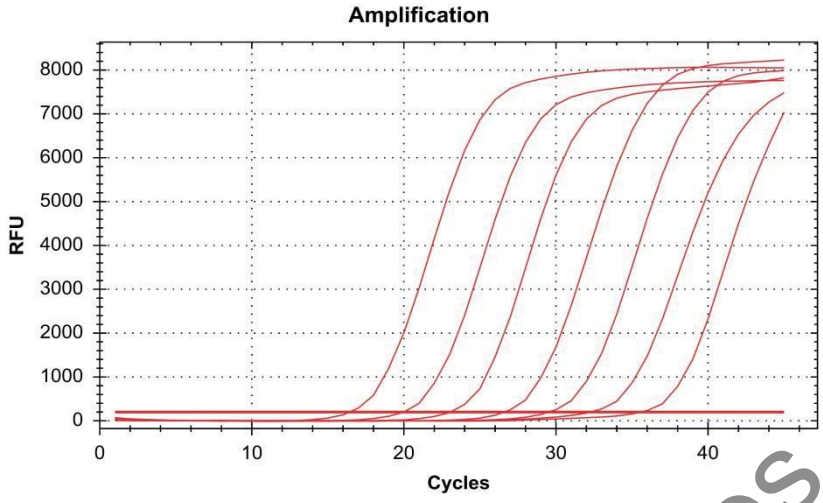


Figure 3. Dilution series of *Giardia lamblia* (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (FAM channel).



For information purposes only

Figure 4. Dilution series of *Entamoeba histolytica* (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (ROX channel).



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the *Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* assays were confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine.

No cross-reactivity of *Cryptosporidium, Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter lari*	-	*Enteropathogenic Escherichia coli*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter fetus*	-	*Klebsiella oxytoca*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter coli*	-	*Listeria monocytogenes*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Candida albicans*	-
Shigella flexneri	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Shigella dysenteriae	-	*Proteus vulgaris*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Salmonella typhi	-	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3	-
Salmonella paratyphi B	-	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Yersinia enterocolitica* O:9	-
Salmonella typhimurium	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Bacteroides fragilis*	
Salmonella bongori	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	Adenovirus serotypes 40/41	
Salmonella enteritidis	-	*Clostridium difficile*	-	Rotavirus A	-
Salmonella enterica subsp. entérica	-	*Clostridium perfringens*	-	Norovirus Genotypes I and II	-
Salmonella pullorum	-	*Enterotoxigenic Escherichia coli*	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
Salmonella gallinarum	-				

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

For information purposes only

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for *Cryptosporidium* was evaluated against *Cryptosporidium parvum* showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for *Giardia lamblia* was evaluated against *Giardia lamblia* showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit for *Entamoeba histolytica* was evaluated against *Entamoeba histolytica* strain DS4-868 showing positive result.

For information purposes only

ANNEX 1:

COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with low profile block, like systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with high or regular profile block, like systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS

Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS

Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

** The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.*

For information purposes only

ANNEX 2:

DETECTION CHANNELS OF MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96 ™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.

For information purposes only

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras fecales, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*.

2. Introducción y explicación

Los protozos entericos siguen causando las enfermedades parasitarias más comunes que afectan a millones de personas cada año y suponen una morbilidad y mortalidad significativamente alta en todo el mundo. Entre ellos *Cryptosporidium* spp, *Entamoeba histolyica* y *Giardia lamblia* son los principales agentes etiológicos.

Cryptosporidium puede transmisirse por varias vías: contacto persona a persona y con animales de compañía y/o de granja, así como ingestión de alimentos, aguas potables y aguas para uso recreativo contaminados. *Cryptosporidium* puede estar presente de forma asintomática o causar diarrea y malestar abdominal con pérdida de peso y mala absorción. La infección por *Giardia lamblia* tiene lugar por transmisión fecal-oral, a través del contacto directo o por ingestión de agua o comida contaminada. La diarrea es el principal síntoma de esta enfermedad pero las manifestaciones clínicas varían, desde infecciones asintomáticas a diarreas agudas, calambres abdominales, hinchazón y flatulencia a menudo acompañadas de náuseas y pérdida de peso. La enfermedad transmitida por *Entamoeba histolytica* se propaga principalmente por agua o comida contaminada con quistes pero también puede transmitirse de persona a persona por vía feco-oral. Las características clínicas de la amoebiasis van desde una colonización asintomática (90% de los casos) hasta una disentería amebiana (dolor estomacal, náuseas o vómitos y diarrea severa hemorrágica y fiebre) o enfermedad invasiva extraintestinal, más comúnmente en forma de abscesos hepáticos.

3. Procedimiento

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* en muestras de heces humanas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen 18S rRNA para *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* respectivamente.

For information purposes only

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5´ exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Tras la amplificación de las secuencias diana de DNA de Cryptosporidium, Giardia lamblia, Entamoeba histolytica y del control interno, *Cryptosporidium* se detecta en el canal Cy5, *Giardia lamblia* se detecta en el canal FAM, *Entamoeba histolytica* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-KGE1SL/ VS-KGE1SH	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-KGE1C	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-KGE106L, VS-KGE106H, VS-KGE112L, VS-KGE112H.

For information purposes only

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-KGE1PL/ VS-KGE1PH	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-KGE1C	*Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-KGE113L y VS-KGE113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.

For information purposes only

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

8. Procedimiento del test

8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20ºC. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción de DNA a partir de muestras de heces humanas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Mobio).
- RIDA® Xtract (R-biopharm).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

For information purposes only

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. PROTOCOLO PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) **Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.**

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) **Añadir muestras y controles.**

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) **Configurar el termociclador.**

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95ºC
45	Desnaturalización	10 seg	95ºC
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60ºC

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales Cy5 (*Cryptosporidium*), FAM (*Giardia lamblia*), ROX (*Entamoeba histolytica*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Cryptosporidium, Giardia lamblia y/o Entamoeba histolytica*. Comprobar la emisión de la

For information purposes only

señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Cryptosporidium	*Giardia lamblia*	*E. histolytica*	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	***Cryptosporidium,*** **Giardia lamblia y *E. histolytica* Positivos**
-	-	-	+	-	+	***Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *E. histolytica* Negativos**
+	-	-	+/-	-	+	***Cryptosporidium* Positivo, *Giardia lamblia* y *E. histolytica* Negativos**
+	+	-	+/-	-	+	***Cryptosporidium* y *Giardia lamblia* Positivos, *E. histolytica* Negativo**
+	-	+	+/-	-	+	***Cryptosporidium* y *E. histolytica* Positivos, *Giardia lamblia* Negativo**
-	+	-	+/-	-	+	***Giardia lamblia* Positivo, *Cryptosporidium* y *E. histolytica* Negativos**
-	+	+	+/-	-	+	***Giardia lamblia* y *E. histolytica* Positivos, *Cryptosporidium* Negativo**
-	-	+	+/-	-	+	***E. histolytica* Positivo, *Crytprosporidium* y *Giardia lamblia* Negativos**
+	+	+	+	+	+	**Inválido**
-	-	-	-	-	-	**Inválido**

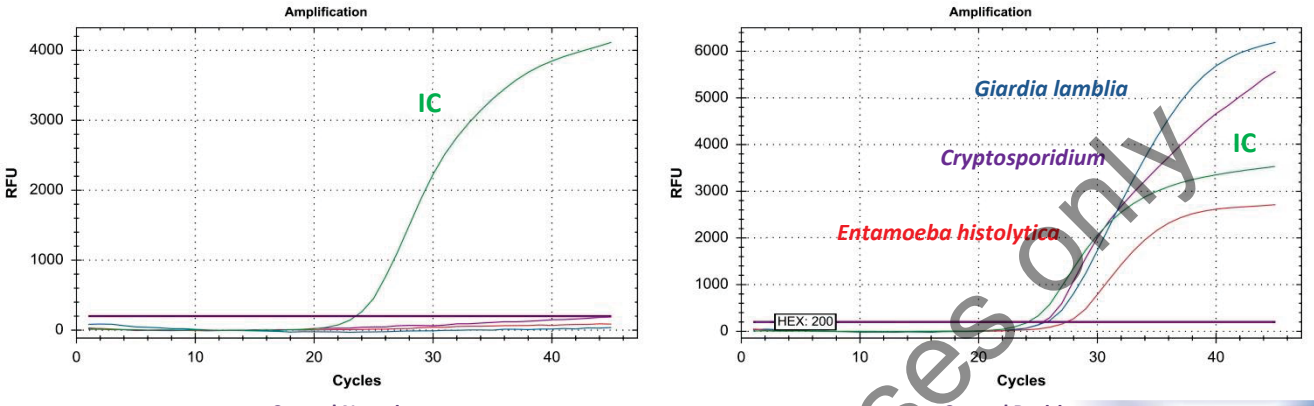
Tabla 4. Interpretación
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

For information purposes only

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo. En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras fecales humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras fecales humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

For information purposes only

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Se evaluaron 172 muestras fecales de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por dos kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) ó FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	38	3*#	41
-	1#	130	131
Total	39	133	172

Tabla 5. Comparativa de resultados de *Cryptosporidium*

 # Estas 4 muestras han sido evaluadas por un ensayo adicional basado en PCR a tiempo real (Hadfield et al., 2011), confirmando nuestros resultados.

** La baja cantidad de DNA molde detectadas en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios.*

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	58	2*	60
-	0	112	112
Total	58	114	172

Tabla 6. Comparativa de resultados de *Giardia lamblia*

** La baja cantidad de DNA molde detectadas en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios.*

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit	RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II (r-Biopharm) + FTD Stool parasites (fast-track DIAGNOSTICS)		
	+	-	Total
+	8Φ	1Φ,*	9
-	0	163	163
Total	8	164	172

Tabla 7. Comparativa de resultados de *Entamoeba histolytica*

For information purposes only

** La baja cantidad de DNA molde detectadas en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios.*

$^{\phi}$ Se obtuvieron resultados positivos para 7 especímenes fecales clínicos y 2 muestras que fueron contaminadas con E. histolytica antes de la extracción de DNA.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* utilizando VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALÍTICA

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥50 copias de DNA por reacción para Cryptosporidium y un límite de detección de ≥10 copias de DNA por reacción para *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (Figura 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de *Cryptosporidium* (10^7-10^2 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).

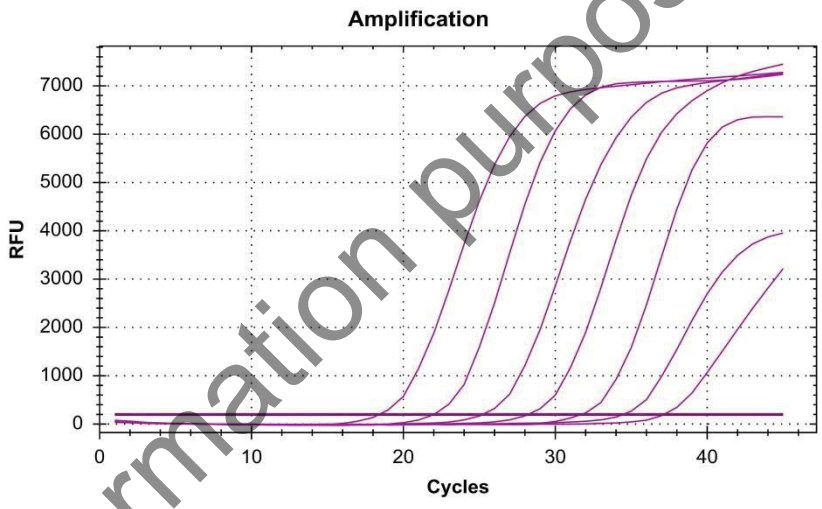
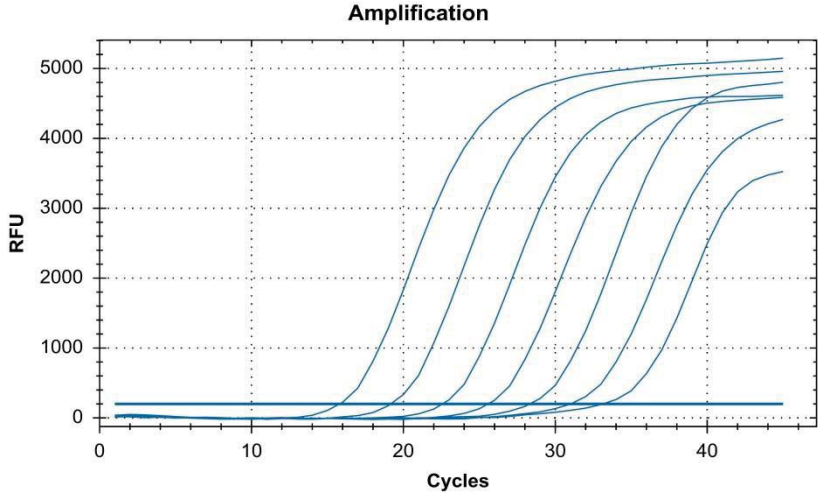
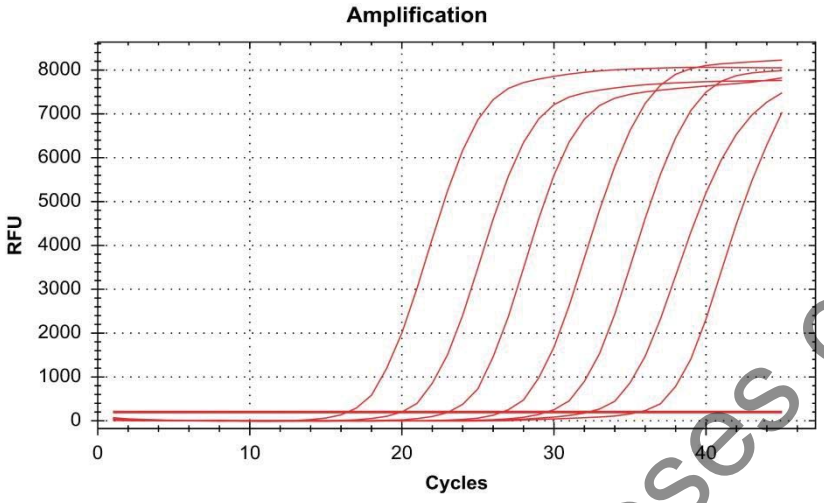


Figura 3. Diluciones seriadas de *Giardia lamblia* (10^7-10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



For information purposes only

Figura 4. Diluciones seriadas de *E. histolytica* (10^7-10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de *Cryptosporidium, Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal.

No se detectaron reacciones cruzadas de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter lari*	-	*Enteropathogenic Escherichia coli*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter fetus*	-	*Klebsiella oxytoca*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter coli*	-	*Listeria monocytogenes*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Candida albicans*	-
Shigella flexneri	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Shigella dysenteriae	-	*Proteus vulgaris*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Salmonella typhi	-	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3	-
Salmonella paratyphi B	-	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Yersinia enterocolitica* O:9	-
Salmonella typhimurium	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Bacteroides fragilis*	-
Salmonella bongori	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	Adenovirus serotipos 40/41	-
Salmonella enteritidis	-	*Clostridium difficile*	-	Rotavirus A	-
Salmonella enterica subsp. entérica	-	*Clostridium perfringens*	-	Norovirus Genotipos I y II	-
Salmonella pullorum	-	*Enterotoxigenic Escherichia coli*	-	Astrovirus Genotipos I-VIII	-
Salmonella gallinarum	-				

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

For information purposes only

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit para *Cryptosporidium* se evaluó frente a *Cryptosporidium parvum*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real *Time PCR Detection Kit para Giardia lamblia* se evaluó frente a *Giardia lamblia*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit para *Entamoeba histolytica* se evaluó frente a *Entamoeba histolytica* cepa DS4-868 mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. J.R. Limor. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(7): 2335-2338.
2. S.E. Stroup et al. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55: 1217-1222
3. S.J. Hadfield et al. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(3): 918-924
4. D.V. den Bossche et al. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *Journal of microbiological methods* 2015; 110: 78-84
5. R.D. Adam. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(3): 447-475.
6. J.J. Verweij et al. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Molecular and Cellular Probes 2003; 17(5): 223-225
7. R. Fotedar *et al.* PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *Journal of Clinical Microbiology 2007*; 45 (3): 1035-1037.
8. R. Haque *et al*. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium spp. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2007*; 76(4): 713-717.
9. Y. Lau *et al.* Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* infections in Orang Asli settlements in Malaysia. *Parasites & Vectors 2013*; 6(1): 250.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

IVD	*In vitro* diagnostic device Producto para diagnóstico *in vitro*		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura	Σ	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia

For information purposes only

ANEXO 1:

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL

Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO

Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

For information purposes only

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

* *El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene®Q o SmartCycler®.*

ANEXO 2:

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96 ™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real.

For information purposes only

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Cryptosporidium, Giardia & E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) y SmartCycler® (Cepheid). Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

For information purposes only

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ is registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

CERTEST BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es CE

For information purposes only